

Rec'd PCT/PTO 14 MAR 2005

10/019543

PCT/JP 01/04153

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

14.06.01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 5月19日

REC'D 03 AUG 2001

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-148726

出 願 人

Applicant(s):

鐘淵化学工業株式会社

BEST AVAILABLE COPY

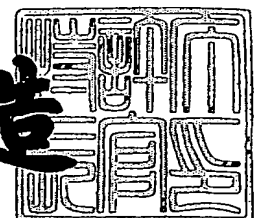
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 7月 6日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3063285

【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4186

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 7/00

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区塩屋町 6 - 3 1 - 1 7 三青荘

 【氏名】 横溝 聡

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県明石市朝霧町 3 - 1 2 3 セゾン朝霧 3 0 4

 【氏名】 福地 健

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県西宮市大森町 1 1 - 3 3

 【氏名】 松本 圭司

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都府中市栄町 1 - 3 1 - 1 0

 【氏名】 高木 正道

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県大宮市プラザ 5 7 - 2

 【氏名】 太田 明德

【特許出願人】

 【識別番号】 000000941

 【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

 【代表者】 武田正利

【代理人】

 【識別番号】 100086586

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 安富 康男

【選任した代理人】

 【識別番号】 100104813

【弁理士】

【氏名又は名称】 古谷 信也

【選任した代理人】

【識別番号】 100108431

【弁理士】

【氏名又は名称】 村上 加奈子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033891

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705256

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

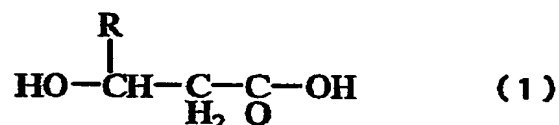
【発明の名称】 形質転換体及びそれを用いたポリエステル製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酵母に、ポリエステルの合成に關与する酵素遺伝子発現カセットが一種以上導入されてなることを特徴とする形質転換体。

【請求項 2】 ポリエステルは、下記一般式 (1) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合体である請求項 1 記載の形質転換体。

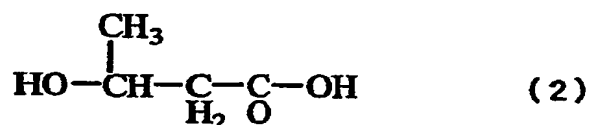
【化 1】



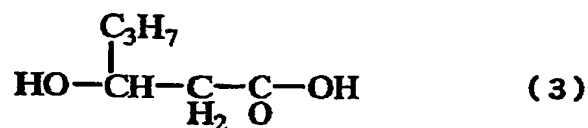
式中、R は、アルキル基を表す。

【請求項 3】 ポリエステルは、下記式 (2) で示される 3-ヒドロキシ酪酸と下記式 (3) で示される 3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステル P (3HB-co-3HH) である請求項 2 記載の形質転換体。

【化 2】



【化 3】



【請求項 4】 酵母が *Aciculoconidium* 属、*Ambrosiomyces* 属、*Arthroascus* 属、*Arxiozyma* 属、*Ashbya* 属、*Babjevia* 属、*Bensingtonia* 属、*Botryoascus* 属、*Botryozyma* 属、*Brettanomyces* 属、*Bullera* 属、*Bulleromyces* 属、*Candida* 属、*Citeromyces* 属、*Clavispora* 属、*Cryptococcus* 属、*Cystofil*

obasidium属、Debaryomyces属、Dekkera属、Dipodascopsis属、Dipodascus属、Eeniella属、Endomycopsella属、Eremascus属、Eremothecium属、Erythrobasidium属、Fellomyces属、Filobasidium属、Galactomyces属、Geotrichum属、Guilliermondella属、Hanseniaspora属、Hansenula属、Hasegawaea属、Holtermannia属、Hormoascus属、Hyphopichia属、Issatchenkia属、Kloeckera属、Kloeckeraspora属、Kluyveromyces属、Kondoa属、Kuraishia属、Kurtzmanomyces属、Leucosporidium属、Lipomyces属、Lodderomyces属、Malassezia属、Metschnikowia属、Mrakia属、Myxozyma属、Nadsonia属、Nakazawaea属、Nematospora属、Ogataea属、Oosporidium属、Pachysolen属、Pachytichospora属、Paffia属、Pichia属、Rhodosporidium属、Rhodotorula属、Saccharomyces属、Saccharomyces属、Saccharomycopsis属、Saitoella属、Sakaguchia属、Saturnospora属、Schizoblastosporion属、Schizosaccharomyces属、Schwanniomyces属、Sporidiobolus属、Sporobolomyces属、Sporopachydermia属、Stephanoascus属、Sterigmatomyces属、Sterigmatosporidium属、Symbiotaphrina属、Sympodiomyces属、Sympodiomycopsis属、Torulaspora属、Trichosporiella属、Trichosporon属、Trigonopsis属、Tsuchiyaea属、Udeniomyces属、Waltomyces属、Wickerhamia属、Wickerhamiella属、Williopsis属、Yamadazyma属、Yarrowia属、Zygoas

cus 属、*Zygosaccharomyces* 属、*Zygowilliopsis* 属又は *Zygozyma* 属である請求項1～3のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項5】 酵母が *Yarrowia lipolytica* である請求項1～4のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項6】 ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現カセットが、酵母で機能するプロモーター、ターミネーターからなる請求項1～5のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項7】 プロモーター、ターミネーターが *Yarrowia lipolytica* 由来である請求項6項に記載の形質転換体。

【請求項8】 プロモーターが *Yarrowia lipolytica* の ALK3 由来である請求項6又は7記載の形質転換体。

【請求項9】 ターミネーターが *Yarrowia lipolytica* の XPR2 由来である請求項6～8のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項10】 ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子が、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子である請求項1～9のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項11】 ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子が、アエロモナス・キャビエの PHA 合成酵素遺伝子、または、PHA 合成酵素遺伝子および (R) 体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ遺伝子である請求項1～10のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項12】 請求項1～11記載のいずれか1項に記載の形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、前記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、共重合ポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、自然環境（土中、河川、海中）

の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子を発酵合成する能力が改善された形質転換体、及び、その形質転換体を利用した共重合ポリエステル製の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例としては3-ヒドロキシ酪酸（以下3HBと略す）のホモポリマーであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下、P（3HB）と略す）であり、1925年に*Bacillus megaterium*で最初に発見された。P（3HB）は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしいグリーンプラスチックとして注目されてきた。しかし、P（3HB）は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲に限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

【0003】

その中で、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報などに3-ヒドロキシ酪酸（3HB）と3-ヒドロキシ吉草酸（3HV）とからなる共重合体（以下P（3HB-co-3HV）と略す）の製造方法が開示されている。このP（3HB-co-3HV）はP（3HB）に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。しかしながら、実際のところP（3HB-co-3HV）は3HVモル分率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される柔軟性が向上しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取っ手など硬質成形体の分野にしか利用されなかった。

【0004】

近年、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸（以下、3HHと略す）との2成分共重合ポリエステル（以下P（3HB-co-3HH）と略す）およびその製造方法について研究がなされた。たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP（3H

B-co-3HH)の製造方法は、土壌より単離されたアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*)を用いてオレイン酸等の脂肪酸やオリブオイル等の油脂から発酵生産するものであった。また、P(3HB-co-3HH)の性質に関する研究もなされている(Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823 (1995))。この報告では炭素数が12個以上の脂肪酸を唯一の炭素源として*A. caviae*を培養し、3HHが11~19mol%のP(3HB-co-3HH)を発酵生産している。このP(3HB-co-3HH)は3HHモル分率の増加にしたがって、P(3HB)の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P(3HB-co-3HV)を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。しかしながら、本製造方法では菌体生産量4g/L、ポリマー含量30%でありポリマー生産性が低いことから、実用化に向け更に高い生産性が得られる方法が探索された。

【0005】

P(3HB-co-3HH)を生産する*A. caviae*よりPHAシンターゼ遺伝子がクローニングされた(T. Fukui, Y. doi, *J. Bacteriol.*, vol. 179, No. 15, 4821-4830 (1997)、特開平10-108682号公報)。本遺伝子を*Ralstonia eutropha*(旧*Alcaligenes eutrophus*)に導入した形質転換株を用いてP(3HB-co-3HH)の生産を行った結果、菌体生産性は4g/L、ポリマー含量は30%であった。更に本形質転換株を炭素源として植物油脂を用いて培養した結果、菌体含量4g/L、ポリマー含量80%が達成された(T. Fukui等 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 333 (1998))。

【0006】

本ポリマーP(3HB-co-3HH)は3HHモル分率を変えることで、硬質ポリマーから軟質ポリマーまで幅広い物性を持つため、テレビの筐体などのように硬さを要求されるものから糸やフィルムなどのような柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できる。しかしながら、これらの製造方法では

本ポリマーの生産性が依然として低く、本ポリマーの実用化に向けた生産方法としては未だ不十分といわざるを得ない。

【0007】

最近になって、3HBの前駆物質である *acetyl-CoA* を効率よく生産すると考えられる酵母を生産菌とした生分解性ポリエステル生産研究がLeafらによって行われた (*Microbiology*, vol. 142, pp1169-1180 (1996))。酵母の一種である *Saccharomyces cerevisiae* に *R. eutropha* のポリエステル重合酵素遺伝子を導入して形質転換体を作製し、グルコースを炭素源として培養することによってP(3HB)の蓄積(ポリマー含量0.5%)を確認している。しかし、本研究で生産されるポリマーは硬くて脆い性質を有するP(3HB)であった。

【0008】

酵母は増殖が早く菌体生産性が高いことで知られている。また、ポリマーの前駆物質である *acetyl-CoA* を効率よく生産すると考えられることから高いポリマー生産性が期待される。さらに、細菌と比べて菌体と培養液との分離が容易であることから、ポリマーの抽出精製工程をより簡単にすることも可能である。そこで、優れた物性を有するP(3HB-co-3HH)を酵母を用いて生産する方法が求められていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記現状に鑑み、ポリエステル合成に関与する遺伝子発現カセットを酵母に導入して形質転換した形質転換体、及び、得られた形質転換体を培養することにより、生分解性かつ優れた物性を有するP(3HB-co-3HH)等のポリエステルを酵母を宿主として製造する方法を提供するものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

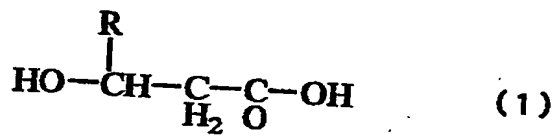
本発明は、酵母に、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現カセットが一種以上導入されてなる形質転換体である。

【0011】

本発明者らは様々な検討を行った結果、下記一般式(1)に示す3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に關与する酵素遺伝子の一種以上のそれぞれに、酵母で実質的に機能するプロモーター、ターミネーターを連結することにより遺伝子発現カセットを作製し、さらに本遺伝子発現カセットを酵母に導入して形質転換株を作製し、本形質転換株を培養することにより、その培養物から下記一般式(1)に示す3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造することに成功した。

【0012】

【化4】



【0013】

式中、Rは、アルキル基を表す。

すなわち、本発明はまた、上記形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、上記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取するポリエステルの製造方法である。

ここで、「実質的」とは遺伝子発現カセットの構築に必要なプロモーター、ターミネーター等の遺伝子配列は、発現に必要な機能を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じていてもよいものとする。

以下に、本発明の詳細を説明する。

【0014】

【発明の実施の形態】

(1) 宿主

使用する酵母には特に制限はなく、菌株の寄託機関(例えばIFO、ATCC等)に寄託されている*Aciculoconidium*属、*Ambrosiozyma*属、*Arthroascus*属、*Arxiozyma*属、*Ashbya*属、*Babjevia*属、*Bensingtonia*属、*Botryoascus*属、*Botryozyma*属、*Brettanomyces*属、*Bullera*属

、Bulleromyces属、Candida属、Citeromyces属、Clavispora属、Cryptococcus属、Cystofilobasidium属、Debaryomyces属、Dekkera属、Dipodascopsis属、Dipodascus属、Eeniella属、Endomycopsisella属、Eremascus属、Eremothecium属、Erythrobasidium属、Fellomyces属、Filobasidium属、Galactomyces属、Geotrichum属、Guilliermondella属、Hanseniaspora属、Hansenula属、Hasegawaea属、Holtermannia属、Hormoascus属、Hyphopichia属、Issatchenkia属、Kloeckera属、Kloeckeraspora属、Kluyveromyces属、Kondoa属、Kuraishia属、Kurtzmanomyces属、Leucosporidium属、Lipomyces属、Loderomyces属、Malassezia属、Metschnikowia属、Mrakia属、Myxozyma属、Nadsonia属、Nakazawaea属、Nematospora属、Ogataea属、Oosporidium属、Pachysolen属、Pachytichospora属、Phaffia属、Pichia属、Rhodosporidium属、Rhodotorula属、Saccharomyces属、Saccharomycodes属、Saccharomycopsis属、Saitoella属、Sakaguchia属、Saturnospora属、Schizoblastosporion属、Schizosaccharomyces属、Schwannomyces属、Sporidiobolus属、Sporobolomyces属、Sporopachydermia属、Stephanoascus属、Sterigmatomyces属、Sterigmatosporidium属、Symbiotaphrina属、Sympodiomyces属、Sympodiomycopsis属、Torulaspora属、Trichosporiella属、Trichosporon属、Trigonopsis属、Tsuchiyaea属、Udeniomyces属、Waltomyces

属、Wickerhamia属、Wickerhamiella属、Williopsis属、Yamadazyma属、Yarrowia属、Zygoascus属、Zygosaccharomyces属、Zygowilliopsis属、Zygozima属などの酵母を使用することができる。

また、本発明の形質転換体において用いられる酵母は、Yarrowia lipolyticaであることが好ましい。

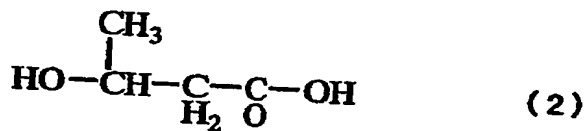
【0015】

(2) ポリエステル合成に関与する遺伝子

ポリエステル合成に関与する遺伝子としては特に限定されないが、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する遺伝子が好ましく、下記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)の合成に関与する遺伝子であることがより好ましい。

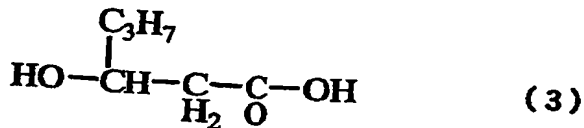
【0016】

【化5】



【0017】

【化6】



【0018】

上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する遺伝子としては特に限定されず、例えば特開平10-108682号公報に記載されているポリエステル重合酵素遺伝子断片を用いることができる。上記ポリエステル重合酵素遺伝子としては、例えば、PHA合成酵

素遺伝子が挙げられる。また、本ポリエステル重合酵素遺伝子と共にポリエステル合成に關与する遺伝子を導入しても良い。これらの遺伝子としては、たとえば、 β 酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアルシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))や、アセチルCoAを二量化してモノマーである3-ヒドロキシブチリルCoAを合成する β ケトチオラーゼ、NADH依存性ヒドラターゼ遺伝子(Peoples OP, et al J. Biol. Chem. 264 (26) 15298-15303 (1989))などが挙げられる。

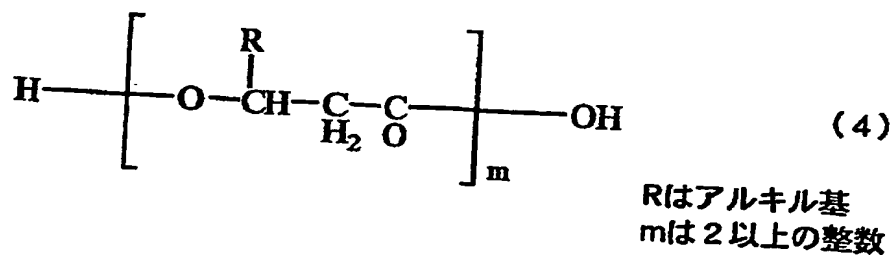
これらの遺伝子は実質的な酵素活性を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じていてもよいものとする。

【0019】

また、上記PHA合成酵素によって合成されるポリエステルは、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるものであり、下記一般式(4)に示される。より好ましい態様においては、上記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)であり、下記一般式(5)に示される。

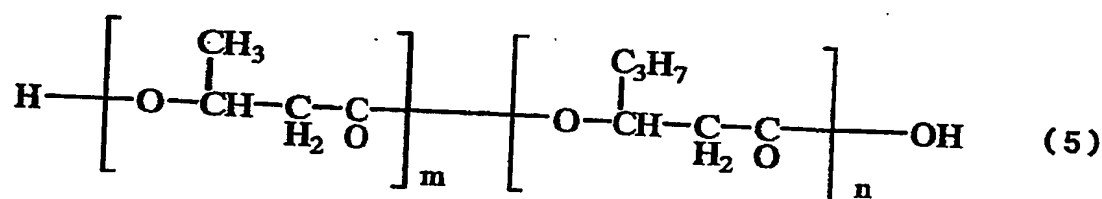
【0020】

【化7】



【0021】

【化 8】



m, n は 1 以上の整数

【0022】

(3) 遺伝子発現カセットの構築

酵母における遺伝子発現のためには、当該遺伝子の 5' 上流にプロモーター、UAS 等の DNA 配列の連結、当該遺伝子の 3' 下流にポリ A 付加シグナル、ターミネーター等の DNA 配列の連結が必要である。これらの DNA 配列は宿主として使用する酵母で機能する配列であればどのような配列でも利用できる。プロモーターには構成的に発現を行うものや誘導的に発現を行うものがあるが、いずれのプロモーターも用いてもよい。

【0023】

また、本発明の形質転換体においては、上記プロモーター、ターミネーターが、*Yarrowia lipolytica* で機能するものであることが好ましく、上記プロモーター、ターミネーターが *Yarrowia lipolytica* 由来であることが好ましい。より好ましくは、*Yarrowia lipolytica* の ALK3 由来のプロモーター、XRP2 由来のターミネーターを利用する。

【0024】

本発明の形質転換体に用いられる遺伝子発現カセットは一例として、次のように構築することができる。

構築に用いられるベクターは、大腸菌において自立増殖するプラスミドであればどのようなベクターでもよく、更に酵母において自立増殖可能な領域を合わせ持っていてよい。酵母において自立増殖できるベクターは、菌体内に保持される。また、遺伝子発現カセットを染色体上に組み込むこともできる。一例として *Yarrowia lipolytica* において自立増殖可能な pSAT4 や p

SUT5を用いることができる(1997年度 東京大学大学院、博士論文「酵母*Yarrowia lipolytica*のn-アルカン誘導型チトクロームP450遺伝子群に関する研究」飯田敏也)。

【0025】

本発明の形質転換体においては、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子がアエロモナス・キャビア(*Aeromonas caviae*)由来の遺伝子であることが好ましく、例えば、*A. caviae*由来のPHA合成酵素遺伝子(以下phaCと略す)(配列番号1)、または、phaCおよび β 酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子(以下phaJと略す)(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))(配列番号2)が好適に用いられる。

これらの構造遺伝子のそれぞれ5'上流に*Y. lipolytica*のAlk3遺伝子のプロモーターALK3p(配列番号3)(GenBank AB010390)を連結することができる。

【0026】

プロモーターと構造遺伝子とを連結するための制限酵素部位を作製するためには、PCR法が利用できる。PCRに用いたプライマー配列を配列番号4から配列番号10に示す。PCRの条件は目的遺伝子断片が増幅できればどのような条件を用いてもよい。

【0027】

プロモーター部分は配列番号3を鋳型にして配列番号4と配列番号5、配列番号5と配列番号6を用いて、それぞれ5'末端がXbaI、3'末端がNdeIのALK3Xと5'末端がSacII、3'末端がNdeIのALK3Sを作製することができる。phaCは配列番号1を鋳型にして配列番号7と配列番号8とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がPstIである約100bpの断片を作製することができる。これに残りのPstI-BamHI約1700bpを結合して、5'末端がNdeI、3'末端がBamHIである完全長のphaC

を作製することができる。p h a Jは配列番号2を鋳型にして配列番号9と配列番号10とを用いて、5'末端がN d e I、3'末端がK p n Iであるp h a Jを作製することができる。ベクターにはプラスミドp S U T 5（図1、配列番号11）とp S U T 5のN d e Iサイトを配列番号12のリンカーDNAを用いて、X b a Iサイトに変更したベクターp S U T 6とを使用することができる。p S U T 6のマルチクローニングサイトのS a c I I、K p n IサイトにA L K 3 Sとp h a Jとを結合し、プラスミドp S U T - p h a J（図2）を構築することができる。次にp S U T 5のマルチクローニングサイトのX b a I、B a m H IサイトにA L K 3 Xとp h a Cとを結合し、プラスミドp S U T - P H A 1（図3）を構築することができる。

【0028】

さらにプラスミドp S U T - p h a JからS a c I IとX b a Iとを用いて、A L K 3 Sとp h a Jと下流にあるターミネーターとを一緒に切り出し、プラスミドp S U T - P H A 1のS a c I I、X b a Iサイトに結合したプラスミドp S U T - P H A 2（図4）の二種類の組換え用プラスミドを構築することができる。以上の方法により、酵母*Yarrowia lipolytica*において上記一般式（1）で示される3-ヒドロキシアルカン酸を重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築することができる。

【0029】

（4）形質転換体の作製

酵母にポリマー合成に関与する遺伝子発現カセット組換えベクターを導入するためには、公知の方法により行うことができる。例えば、カルシウム法（L e d e r b e r g, E. M. et al., J. Bacteriol. 119, 1072（1974））やエレクトロポレーション法（Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1. 8. 4頁, 1994年）等を用いることができる。また、Fast TrackTM-Yeast Transformation Kit_{SM}（Geno Technology）のような市販の形質転換キットを利用することもできる。

一例として宿主として、*Y. lipolytica* C X A U 1株（T. I i d

a, et al Yeast, 14, 1387-1397 (1998)) を用いることができる。本菌株に上記の形質転換法を用いてポリマー合成に関与する遺伝子発現カセットを形質転換し、pSUT-PHA1を有する*Y. lipolytica* PHA1株と、pSUT-PHA2を有する*Y. lipolytica* PHA2株を作製することができる。

【0030】

(5) ポリエステルの製造

本発明のポリエステルの製造方法では、本発明の形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取する。

本発明の形質転換体を培養することによるポリエステルの製造は、次のようにして行うことができる。培養に用いる炭素源としては、酵母が資化できるものであればどのようなものでもよい。また、プロモーターの発現が誘導型である場合には、適時誘導物質を添加すればよい。誘導物質が主要炭素源である場合もある。炭素源以外の栄養源としては窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の生育可能な温度であればよいが、20℃から40℃好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた該培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すればよい。

【0031】

炭素源としてはグルコース、グリセリン、シュクロース等の炭水化物や油脂類や脂肪酸類さらにはn-パラフィン等を用いることができる。油脂としては、例えばナタネ油、ヤシ油、パーム油、パーム核油などが挙げられる。脂肪酸としてはヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和・不飽和脂肪酸、又は、これら脂肪酸のエステルや塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。一例として*Yarrowia lipolytica*の培養において、炭素源として油脂を用いて培養することもできる。また、油脂を資化ができないかまたは効率よく資化できない酵母では、培地中にリパーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リパーゼ遺伝子を形質転換することにより、油脂資化能を付与することもできる。

【0032】

また、炭素源として奇数の炭素鎖を有する脂肪酸やn-パラフィン等を用いた場合、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの炭素鎖に奇数成分の割合を高めることができる。

【0033】

窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

【0034】

その他の有機栄養源としてはアミノ酸類、例えばグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなどや、ビタミン類、例えばビタミンB₁、ビタミンB₁₂、ビオチン、ニコチン酸アミド、パントテン酸、ビタミンC等が挙げられる。

【0035】

本発明において、ポリエステルの菌体からの回収は例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器などで菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体をクロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液を濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。沈殿したポリエステルを濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収することができる。

得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行う。

【0036】

本発明のポリエステルの製造方法は、上述のような構成からなるので、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを生産性よく製造することができる。

また、上述したプラスミド pSUT-PHA1、pSUT-PHA2 を有する *Y. lipolytica* 組換え株を作製し、培養する方法により、上記式 (2) で示される 3-ヒドロキシ酪酸と上記式 (3) で示される 3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステル P (3HB-co-3HH) を製造することができる。

【0037】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

【0038】

(実施例 1)

組換えプラスミドおよび組換え株の構築

ポリエステル合成に関与する遺伝子として、*A. caviae* 由来の重合酵素遺伝子 (以下 phaC と略す) (配列番号 1) と、 β 酸化経路の中間体のエノイル CoA をモノマーである (R)-3-ヒドロキシアシル CoA に変換する (R) 体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ遺伝子 (以下 phaJ と略す) (T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999)) (配列番号 2) を使用した。これらの遺伝子が *Y. lipolytica* で発現するように、それぞれの 5' 上流に *Y. lipolytica* の Alk3 遺伝子のプロモーター ALK3p (配列番号 3) (GenBank AB010390) を連結することにした。プロモーターと構造遺伝子とを連結するための制限酵素部位を作製するためには、PCR 法を利用した。PCR に用いたプライマー配列を配列番号 4 から配列番号 10 に示す。PCR の条件は 94℃ 1 分、55℃ 2 分、72℃ 3 分を 1 サイクルとし、これを 25 回繰り返して、目的遺伝子断片を増幅した。ポリメラーゼは宝酒造 (株) の ExTaq を使用した。プロモーター部分は配列番号 3 を鋳型にして配列番号 4 と配列番号 5、配列番号 5 と配列番号 6 を用いて、それぞれ 5' 末端が XbaI、3' 末端が NdeI の ALK3X と 5' 末端が SacII、3' 末端が NdeI の ALK3S とを作製した。

【0039】

p h a Cは配列番号1を鋳型にして配列番号7と配列番号8とを用いて、5'末端がN d e I、3'末端がP s t Iである約100bpの断片を作製した。これに残りのP s t I-B a m H I断片約1700bpを結合して、5'末端がN d e I、3'末端がB a m H Iである完全長のp h a Cを作製した。p h a Jは配列番号2を鋳型にして配列番号9と配列番号10とを用いて、5'末端がN d e I、3'末端がK p n Iであるp h a Jを作製した。

【0040】

ベクターにはプラスミドp S U T 5 (図1、配列番号11)とp S U T 5のN d e Iサイトを配列番号12のリンカーDNAを用いて、X b a Iサイトに変更したベクターp S U T 6とを使用した。p S U T 6のマルチクローニングサイトのS a c I I、K p n IサイトにA L K 3 Sとp h a J jとを結合し、プラスミドp S U T-p h a J (図2)を構築した。次にp S U T 5のマルチクローニングサイトのX b a I、B a m H IサイトにA L K 3 Xとp h a Cとを結合し、プラスミドp S U T-P H A 1 (図3)を構築することができる。さらにプラスミドp S U T-p h a JからS a c I IとX b a Iとを用いて、A L K 3 Sとp h a Jと下流にあるターミネーターとを一緒に切り出し、プラスミドp S U T-P H A 1のS a c I I、X b a Iサイトに結合したプラスミドp S U T-P H A 2 (図4)の二種類の組換え用プラスミドを構築した。以上の方法により、酵母*Yarrowia lipolytica*において上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築した。

【0041】

宿主には*Y. lipolytica* CXAU1株(T. Iida, et al Yeast, 14, 1387-1397 (1998))を使用した。宿主に構築したプラスミドを導入するために、Fast TrackTM-Yeast Transformation Kit_{SM} (Geno Technology)を使用した。プロトコルにしたがって操作し、選択プレート(0.67w/v% Yeast Nitrogen base without amino acid

、2w/v%グルコース、24mg/Lアデニン塩酸塩、2w/v%寒天) を使用して組換え株を取得した。

【0042】

(実施例2)

P (3HB-co-3HH) の生産

プラスミドpSUT5、pSUT-PHA1、pSUT-PHA2を有するY.
lipolytica組換え株を次のように培養した。前培地はYPD培地(1
w/v%Yeast-extract、2w/v%Bacto-Pepton、
2w/v%グルコース)を使用した。ポリエステル生産培地には1/4YP培地
(0.25w/v%Yeast-extract、0.5w/v%Bacto-
Pepton)とミネラル培地(0.7w/v% KH_2PO_4 、1.3w/v%
(NH_4) $_2\text{HPO}_4$ 、0.5w/v%プロエキスパ-12(播州調味料)
、0.04w/v%アデニン、1ppmチアミン塩酸塩、1v/v%微量金属塩
溶液(0.1N塩酸に8w/v% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.6w/v% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、
0.9w/v% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05w/v% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、
0.1w/v% $\text{MnSO}_4 \cdot 6-7\text{H}_2\text{O}$ 、1w/v%NaCl))にパーム油を2w/v%を添加したものを使用した。

【0043】

各組換え株のグリセロールストック100 μ lを100mlの前培地が入った5
00ml坂口フラスコに接種して20時間培養し、500mLの生産培地を入れた
2L坂口フラスコに1v/v%接種した。これを培養温度30℃、振盪速度1
20rpm、培養時間はYPD培地は24時間、ミネラル培地は72時間という
条件で培養した。培養液をオートクレーブ後、遠心分離によって菌体を回収し、
メタノールで洗浄した後、凍結乾燥して乾燥菌体重量を測定した。

【0044】

得られた乾燥菌体を粉碎し、クロロホルムを100ml添加し一晚攪拌して抽出
した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで1-2mlにまで濃縮し
、濃縮液に10mlのヘキサンを添加して、ヘキサン不溶物を析出させた。

【0045】

得られたヘキサン不溶物約2mgに500 μ lの硫酸-メタノール混液(15:85)と500 μ lのクロロホルムとを添加して密栓し、100℃で140分間加熱することでポリエステル分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに0.3gの炭酸水素ナトリウムを添加し、中和した。これに1mlのジイソプロピルエーテルを添加して攪拌機を用いて攪拌した。遠心分離して有機溶媒層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所GC-17A、キャピラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1(カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4 μ m)を用いた。温度条件は、初発温度100℃から8℃/分の速度で昇温した。得られた分析結果を表1に、またその時のサンプル(3)のチャートを図6に示す。また、得られたヘキサン不溶物のNMR分析(JEOL、JNM-EX400)、IR分析(島津製作所、DR-800)も行った。その一例としてサンプル(6)の結果を図7、図8に示す。

【0046】

【表1】

培養および分析結果

サンプル	培地	菌株	菌体量 (g/L)	ポリマー蓄積量 (wt%)	3HH分率 (mol%)
(1)	1/4YP培地	コントロール	3.56	8.9×10^{-2}	
(2)		PHA1株	3.65	1.9×10^{-1}	
(3)		PHA2株	3.43	2.6×10^{-1}	15(GC測定)
(4)	ミネラル培地	コントロール	0.15	6.7×10^{-2}	
(5)		PHA1株	0.19	1.4×10^{-1}	
(6)		PHA2株	0.17	1.8	27(NMR測定)

【0047】

この結果から、酵母を用いて作製した形質転換体から共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)が生産できることがわかった。また、酵母にもごく僅かながらポリマーが存在することがわかった。

【0048】

【発明の効果】

本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する上記一般式(1)で示される3

ーヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合体を、酵母を用いて生産することが可能となった。

【 0 0 4 9 】

【配列表】

<110> 鐘淵化学工業株式会社 KANAKA CORPORATION

<120> 形質転換体及びそれを用いたポリエステルの製造方法

<130> TKS-4186

<160> 12

<210> 1

<211> 1785

<212> DNA

<213> *Aeromonas caviae*

<220>

<221> CDS

<222> 1..1782

<400> 1

atg agc caa cca tct tat ggc ccg ctg ttc gag gcc ctg gcc cac tac	48
aat gac aag ctg ctg gcc atg gcc aag gcc cag aca gag cgc acc gcc	96
cag gcg ctg ctg cag acc aat ctg gac gat ctg ggc cag gtg ctg gag	144
cag ggc agc cag caa ccc tgg cag ctg atc cag gcc cag atg aac tgg	192
tgg cag gat cag ctc aag ctg atg cag cac acc ctg ctc aaa agc gca	240
ggc cag ccg agc gag ccg gtg atc acc ccg gag cgc agc gat cgc cgc	288
ttc aag gcc gag gcc tgg agc gaa caa ccc atc tat gac tac ctc aag	336

cag tcc tac ctg ctc acc gcc agg cac ctg ctg gcc tcg gtg gat gcc 384
 ctg gag ggc gtc ccc cag aag agc cgg gag cgg ctg cgt ttc ttc acc 432
 cgc cag tac gtc aac gcc atg gcc ccc agc aac ttc ctg gcc acc aac 480
 ccc gag ctg ctc aag ctg acc ctg gag tcc gac ggc cag aac ctg gtg 528
 cgc gga ctg gcc ctc ttg gcc gag gat ctg gag cgc agc gcc gat cag 576
 ctc aac atc cgc ctg acc gac gaa tcc gcc ttc gag ctc ggg cgg gat 624
 ctg gcc ctg acc ccg ggc cgg gtg gtg cag cgc acc gag ctc tat gag 672
 ctc att cag tac agc ccg act acc gag acg gtg ggc aag aca cct gtg 720
 ctg ata gtg ccg ccc ttc atc aac aag tac tac atc atg gac atg cgg 768
 ccc cag aac tcc ctg gtc gcc tgg ctg gtc gcc cag ggc cag acg gta 816
 ttc atg atc tcc tgg cgc aac ccg ggc gtg gcc cag gcc caa atc gat 864
 ctc gac gac tac gtg gtg gat ggc gtc atc gcc gcc ctg gac ggc gtg 912
 gag gcg gcc acc ggc gag cgg gag gtg cac ggc atc ggc tac tgc atc 960
 ggc ggc acc gcc ctg tcg ctc gcc atg ggc tgg ctg gcg gcg cgg cgc 1008
 cag aag cag cgg gtg cgc acc gcc acc ctg ttc act acc ctg ctg gac 1056
 ttc tcc cag ccc ggg gag ctt ggc atc ttc atc cac gag ccc atc ata 1104
 gcg gcg ctc gag gcg caa aat gag gcc aag ggc atc atg gac ggg cgc 1152
 cag ctg gcg gtc tcc ttc agc ctg ctg cgg gag aac agc ctc tac tgg 1200
 aac tac tac atc gac agc tac ctc aag ggt cag agc ccg gtg gcc ttc 1248
 gat ctg ctg cac tgg aac agc gac agc acc aat gtg gcg ggc aag acc 1296
 cac aac agc ctg ctg cgc cgt ctc tac ctg gag aac cag ctg gtg aag 1344
 ggg gag ctc aag atc cgc aac acc cgc atc gat ctc ggc aag gtg aag 1392
 acc cct gtg ctg ctg gtg tcg gcg gtg gac gat cac atc gcc ctc tgg 1440
 cag ggc acc tgg cag ggc atg aag ctg ttt ggc ggg gag cag cgc ttc 1448
 ctc ctg gcg gag tcc ggc cac atc gcc ggc atc atc aac ccg ccg gcc 1536
 gcc aac aag tac ggc ttc tgg cac aac ggg gcc gag gcc gag agc ccg 1584
 gag agc tgg ctg gca ggg gcg acg cac cag ggc ggc tcc tgg tgg ccc 1632
 gag atg atg ggc ttt atc cag aac cgt gac gaa ggg tca gag ccc gtc 1680
 ccc gcg cgg gtc ccg gag gaa ggg ctg gcc ccc gcc ccc ggc cac tat 1728

gtc aag gtg cgg ctc aac ccc gtg ttt gcc tgc cca aca gag gag gac 1776
gcc gca tga 1785

<210> 2

<211> 405

<212> DNA

<213> *Aeromonas caviae*

<220>

<221> CDS

<222> 1..402

<400> 2

atg agc gca caa tcc ctg gaa gta ggc cag aag gcc cgt ctc agc aag 48
cgg ttc ggg gcg gcg gag gta gcc gcc ttc gcc gcg ctc tcg gag gac 96
ttc aac ccc ctg cac ctg gac ccg gcc ttc gcc gcc acc acg gcg ttc 144
gag cgg ccc ata gtc cac ggc atg ctg ctc gcc agc ctc ttc tcc ggg 192
ctg ctg ggc cag cag ttg ccg ggc aag ggg agc atc tat ctg ggt caa 240
agc ctc agc ttc aag ctg ccg gtc ttt gtc ggg gac gag gtg acg gcc 288
gag gtg gag gtg acc gcc ctt cgc gag gac aag ccc atc gcc acc ctg 336
acc acc cgc atc ttc acc caa ggc ggc gcc ctc gcc gtg acg ggg gaa 384
gcc gtg gtc aag ctg cct taa 405

<210> 3

<211> 1036

<212> DNA

<213> *Yarrowia lipolytica*

<220>

<223> promoter ALK3p

<400> 3

```

ctgcagcggc gagaccggtt ctgggccgac tacgacgtgc ctggagggac gctccgggag 60
aatctctttg gacgggccaa gatcttcccc gaccaccctg ccggacagta caagtgggaa 120
gaggggggagt ttcccttgac caagagtgc aagagtgaga acggcaatgg agtcaatgga 180
gatgagcccg ctactaagaa acaaaaaatc tgaacaagag ccggttttag tacgatacaa 240
gagccggtac gtggacatgc agctgctttt cgaacatgaa gggagcacga cccacgtat 300
cagtattatg caagggacca gaagtggcct cggcaaaaga ttggcctcgg tcaacaaaag 360
gtcatcatat ccgtctccgc atccgtctgt acgtgaatta tggtacttgt atctttactg 420
tactggtttg gagctacgtc gccaaactaat gccaacacgt cctgtggtgt gtctataggt 480
atgtaataca agtacgagta aatgtattgt actggtgcag cacagtagat gacggagacg 540
atgaatcggg caccaccac aaacattgcc tccaaacacc gttatattgt ctactgtcg 600
tggtgagac agactcctcg gggccttgta agagggggaa tgtgtgagac agatgccac 660
aagtgaccat gcattttgtg gggcaggaga aaaaccaatg tttgtgggga tagaaccat 720
caaatgaatc taaatgaact ctcccaaaat gaaccactct ctctctcaa tcaaagccct 780
gcgaaatgtc ctccgtctgt ttctcggacc cttagccgta cgacgccata ttacgatagc 840
ccgccacctt aatgcgttta acttgcacgc atgcgtctgc atacagctgc atctgtcata 900
tatgcacat ttccccacac aactgaagtt tatatatata tactgtaagg actcctgaag 960
tggcacgaac acacctgac acagcaacat tacagtacac tactctgctc gtatittaca 1020
atactggacg aaaatg

```

1036

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

gctctagact gcagcggcga gaccggttct gg

32

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

ggacacatat gcgtccagta ttgtaaaata cgagc

35

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 6

tccccgcggc tgcagcggcg agaccggttc tgg

33

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

ggacacatat gagccaacca tcttatggcc c

31

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

cccagatcgt ccagattggt ctgcag

26

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

ggacacatat gagcgacaaa tccctggaag t

31

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

ggggtacctt aaggcagctt gaccacggc

29

<210> 11

<211> 5804

<212> DNA

<213> E.coli, Yarrowia lipolytica

<220>

<223> plasmid pSUT5

<400> 11

```

aggccattct cgttactgcc aaaacaccac ggtaatcggc cagacaccat ggacgagtat   60
ctgtctgact cgtcattgcc gcctttggag tacgactcca actatgagtg tgcttggatc  120
actttgacga tacattcttc gttggaggct gtgggtctga cagctgcgtt ttcggcgcgg  180
ttggccgaca acaatatcag ctgcaacgtc attgctggct ttcacatga tcacattttt  240
gtcggcaaag gcgacgcca gagagccatt gacgttcttt ctaatttgga ccgatagccg  300
tatagtccag tctatctata agttcaacta actcgtaact attaccataa catatacttc  360
actgccccag ataaggttcc gataaaaagt tctgcagact aaatttattt cagtctcttc  420
ttcaccacca aaatgccctc ctacgaagct cgagctaacg tccacaagtc cgcctttgcc  480
    
```

gctcgagtgc tcaagctcgt ggcagccaag aaaaccaacc tgtgtgcttc tctggatgtt 540
 accaccacca aggagctcat tgagcttgcc gataaggctg gaccttatgt gtgcatgac 600
 aagaccata tcgacatcat tgacgacttc acctacgccg gcactgtgct cccctcaag 660
 gaacttgctc ttaagcacgg tttcttctg ttcgaggaca gaaagttcgc agatattggc 720
 aacactgtca agcaccagta caagaacggt gtctaccgaa tcgccgagtg gtccgatatc 780
 accaacgccc acggtgtacc cggaaccgga atcattgctg gcctgcgagc tgggtccgag 840
 gaaactgtct ctgaacagaa gaaggaggac gtctctgact acgagaactc ccagtacaag 900
 gagttcctgg tcccctctcc caacgagaag ctggccagag gtctgctcat gctggccgag 960
 ctgtcttgca agggctctct ggccactggc gactactcca agcagacat tgagcttgcc 1020
 cgatccgacc ccgagtttgt ggttggcttc attgccaga accgacctaa gggcgactct 1080
 gaggactggc ttattctgac ccccggggtg ggtcttgacg acaagggaga cgctctcgga 1140
 cagcagtacc gaactgttga ggatgtcatg tctaccgaa cggatatcat aattgtcggc 1200
 cgaggctgtg acggccagaa ccgagatcct attgaggagg ccaagcgata ccagaaggct 1260
 ggctgggagg cttaccagaa gattaactgt tagaggttag actatggata tgtcatttaa 1320
 ctgtgtatat agagagcgtg caagtatgga gcgcttgctc agcttgtatg atggtcagac 1380
 gacctgtctg atcgagtatg tatgatactg cacaacctgt gtatccgcat gatctgtcca 1440
 atggggcatg ttgttgtgtt tctcgatacg gagatgctgg gtacaagtag ctaatacgat 1500
 tgaactactt atacttatat gaggcttgaa gaaagctgac ttgtgtatga cttattctca 1560
 actacatccc cagtcacaat accaccactg cactaccact acacaaaaac catgatcaaa 1620
 ccacccatgg acttcctgga ggcagaagaa cttgttatgg aaaagctcaa gagagagaag 1680
 ccaagatact atcaagacat gtgtcgcaac ttcaaggagg accaagctct gtacaccgag 1740
 aaacaggcta gctcgtcgtg ttcaggaact gttcgatggt tcggagagag tcgccgcca 1800
 gaacatacgc gcaccgatgt cagcagacag ccttattaca agtatattca agcaagtata 1860
 tccgtagggt gcgggtgatt tggatctaag gttcgtactc aacactcacg agcagcttgc 1920
 ctatgttaca tccttttate agacataaca taattggagt ttacttacac acggggtgta 1980
 cctgtatgag caccacctac aattgtagca ctggtacttg taaaagaat ttattcgtac 2040
 gaatcacagg gacggccgcc ctcaccgaac cagcgaatac ctcagcggtc ccctgcagtg 2100
 actcaacaaa gcgatatgaa catcttgcga tggatcctg ctgatagttt ttactgtaca 2160
 aacacctgtg tagctccttc tagcatTTTT aagtattca cactcaagg ggagggataa 2220

attaaataaa ttccaaaagc gaagatcgag aaactaaatt aaaattccaa aaacgaagtt 2280
 ggaacacaac cccccgaaaa aaaacaacaa acaaaaaacc caacaaaata aacaaaaaca 2340
 aaataaatat ataactacca gtatctgact aaaagttcaa atactcgtac ttacaacaaa 2400
 tagaaatgag cgggccaaaa ttctgcagaa aaaaatttca aacaagtact ggtataatta 2460
 aattaaaaaa cacatcaaag tatkataacg ttagttatit tattttatit aataaaaagaa 2520
 aacaacaaga tgggctcaaa actttcaact tatacgatac ataccaata acaatttagt 2580
 atttatctaa gtgcttttcg tagataatgg aatacaaatg gatatccaga gtatacacat 2640
 ggatagtata cactgacacg acaattctgt atctctttat gttactact gtgaggcatt 2700
 aaatagagct tgatatataa aatgttacat ttcacagtct gaacttttgc agattaccta 2760
 atttggttaag atattaatta tgaactgaaa gttgatggca tccctaaatt tgatgaaaga 2820
 tgaaattgta aatgagggtg taaaagagct acagtcgttt tgttttgaga taccatcatc 2880
 tctaacgaaa tatctattaa aaatctcagt gtgatcatga gtcattgcc aacctggaaa 2940
 tgtcatcatg gctgatattt ctaactgttt acttgagata aatataat tacaagaact 3000
 tcccttgaaa ttaatttaga tataaaatgt ttgcgggcaa gttactacga ggaataaatt 3060
 atatctgttg actagaagtt atgaacattc agtatatatg cacatataat aaccaacttc 3120
 ggcccttttcg tctcgcgcgt ttcgggtgat acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 3180
 cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg 3240
 cgtcagcggg tgttggcggg tgcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 3300
 tactgagagt gcaccatacg cgcgctatag ggcgaattgg agctccaccg cgggtggcggc 3360
 cgctctagaa ctagtggatc ccccgggctg caggaattcg atatcaagct tatcgatacc 3420
 gtcgacctcg agggggggcc cggtagccag cttttgtccc tgcgcgctat gcggtgtgaa 3480
 ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcatacagg gctgcattaa tgaatcggcc 3540
 aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc ctaggcaatt aacagatagt 3600
 ttgccggtga taattctctt aacctccac actcctttga cataacgatt tatgtaacga 3660
 aactgaaatt tgaccagata ttgttgtaaa tagaaaatct ggcttgtagg tggcaaaatc 3720
 ccgtctttgt tcatcaattc cctctgtgac tactcgtcat ccctttatgt tcgactgtcg 3780
 tatttcttat ttccataca tatgcaagt agatgcccg gtcctcctcg ctactgact 3840
 cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatc 3900
 ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 3960

aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg 4020
acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa 4080
gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc 4140
ttaccggata cctgtccgcc ttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac 4200
gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 4260
ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccgg 4320
taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgagg 4380
atgtagggcg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 4440
cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 4500
cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgttgc aagcagcaga 4560
ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat ctttctacg gggcttgacg 4620
ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggctat gagattatca aaaaggatct 4680
tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt 4740
aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtaggc accatatctca gcgatctgtc 4800
tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg 4860
gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgtca ccggctccag 4920
atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt 4980
tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag 5040
ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgctcgtcgt 5100
ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca 5160
tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagtgg 5220
ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat 5280
ccgtaagatg cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgt 5340
tgCggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca 5400
gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct 5460
taccgtgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat 5520
cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa 5580
aggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cticctttt caatattatt 5640
gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa 5700

ataaacaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa 5760
ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacg 5804

<210> 12

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker DNA

<400> 12

tactctagag

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例においてベクターとして使用したプラスミド p S U T 5 を示す模式図である。

【図 2】

実施例において構築したプラスミド p S U T - p h a J を示す模式図である。

【図 3】

実施例において構築したプラスミド p S U T - P H A 1 を示す模式図である。

【図 4】

実施例において構築したプラスミド p S U T - P H A 2 を示す模式図である。

【図 5】

本発明の形質転換体を作製する際に用いられるプラスミドの構築方法を示したプラスミド構築図である。

【図 6】

実施例において製造されたポリエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した結果である。

【図 7】

実施例において製造されたポリエステルを NMR 分析した結果のチャートである。

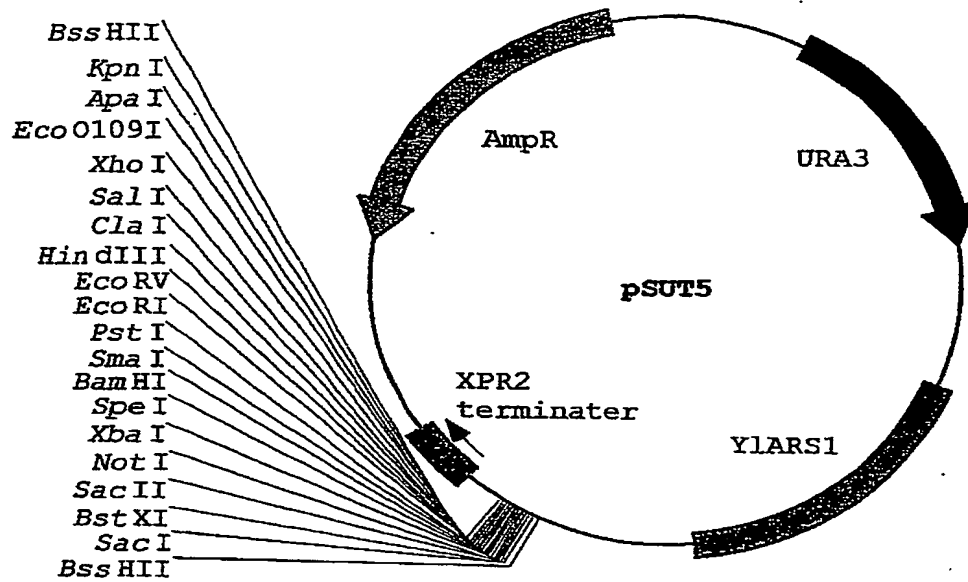
【図 8】

実施例において製造されたポリエステルの IR 分析のチャートである。

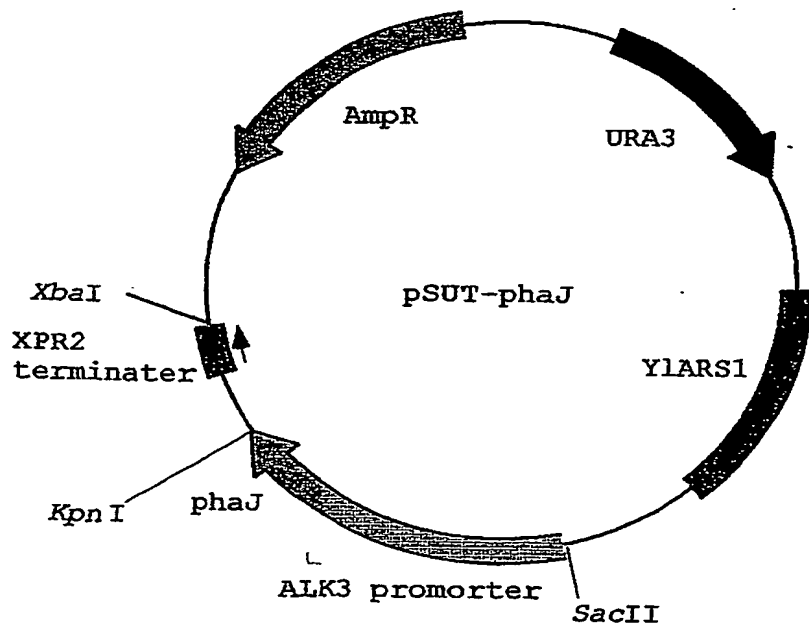
【書類名】

図面

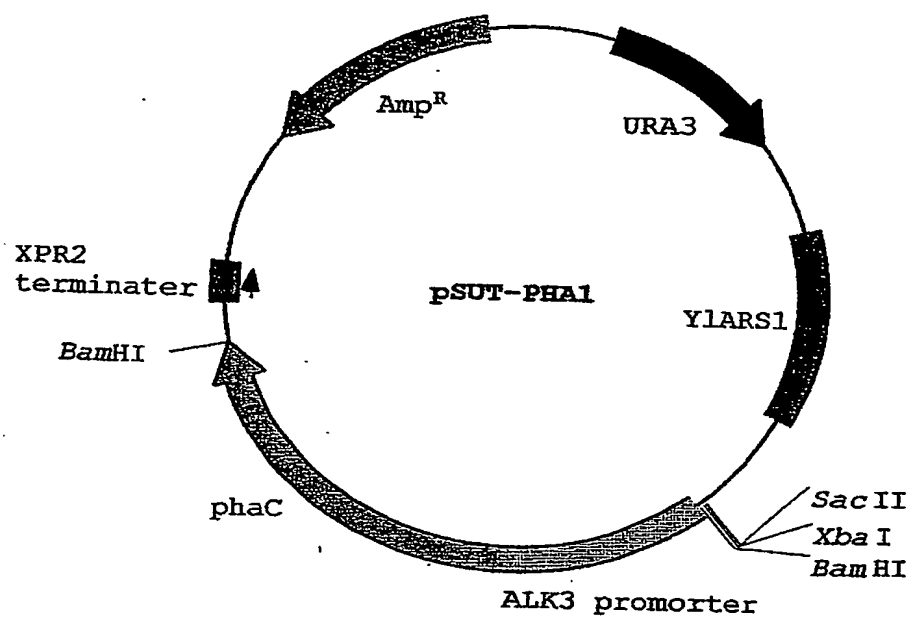
【図1】



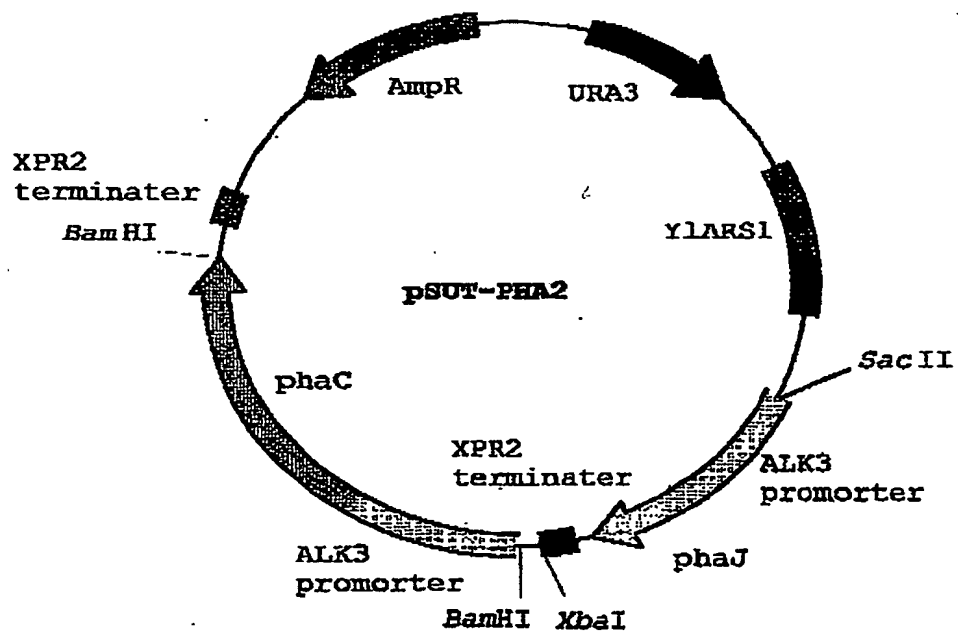
【図2】



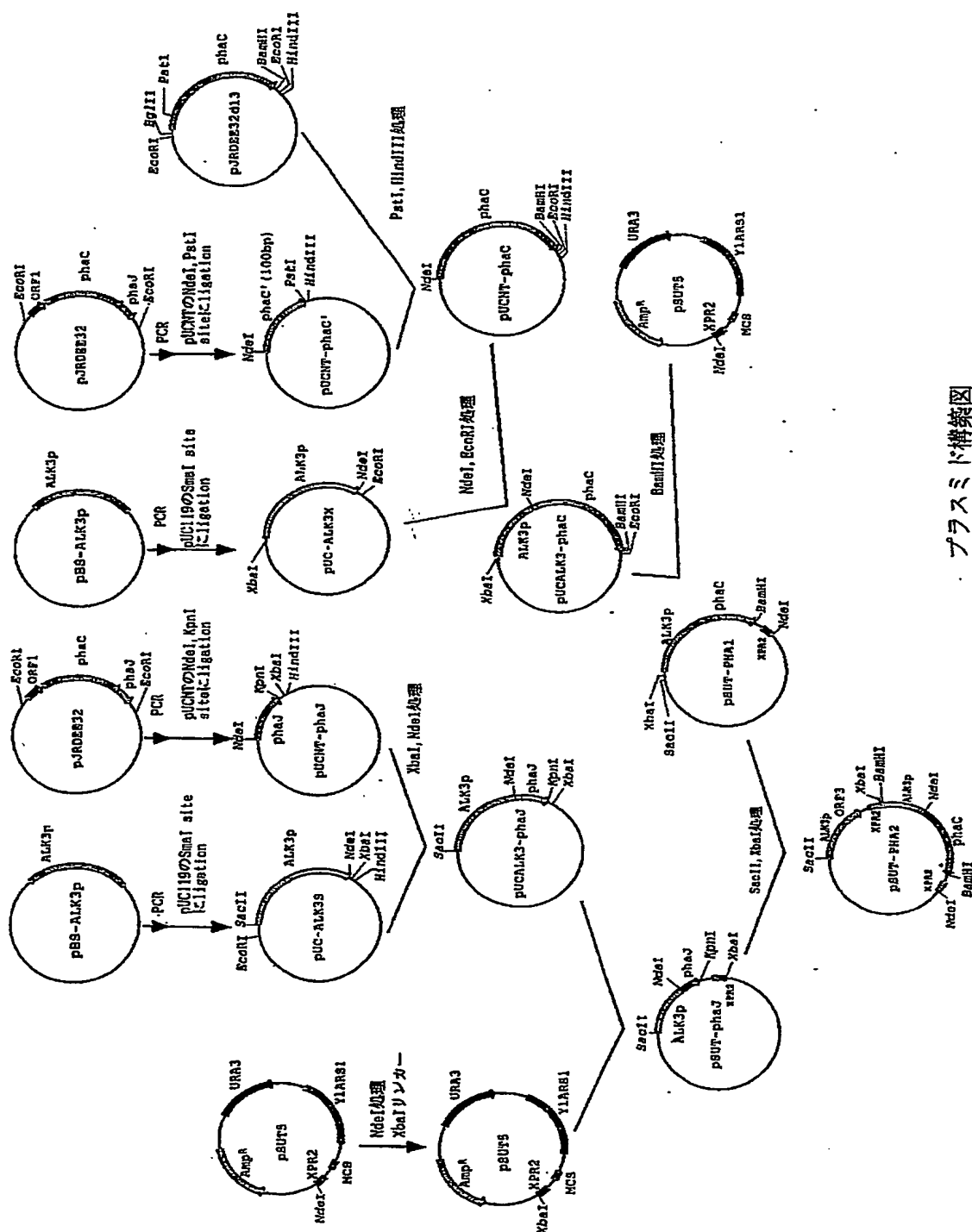
【図3】



【図4】

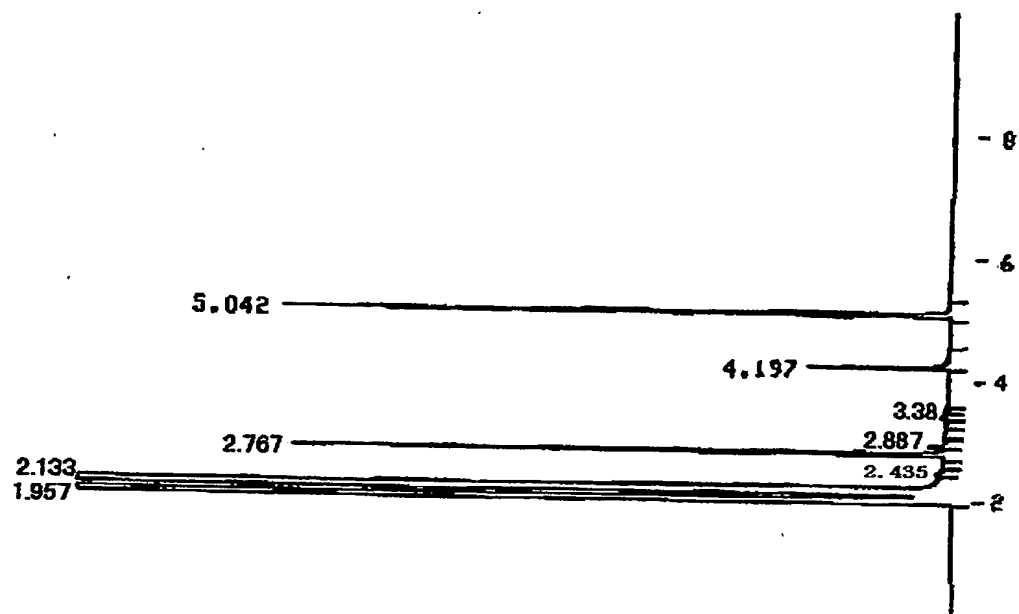


【図 5】

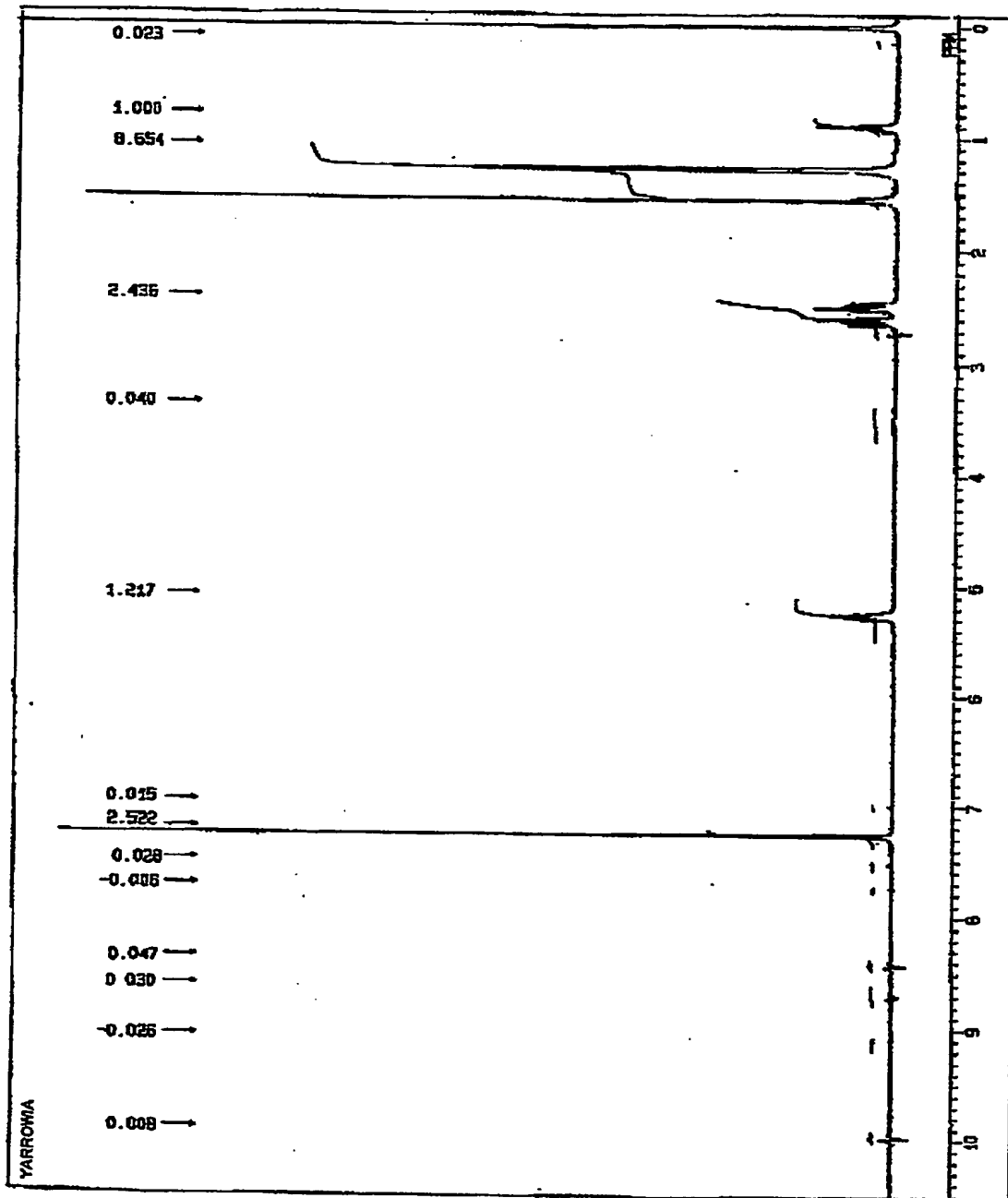


プラスミド構築図

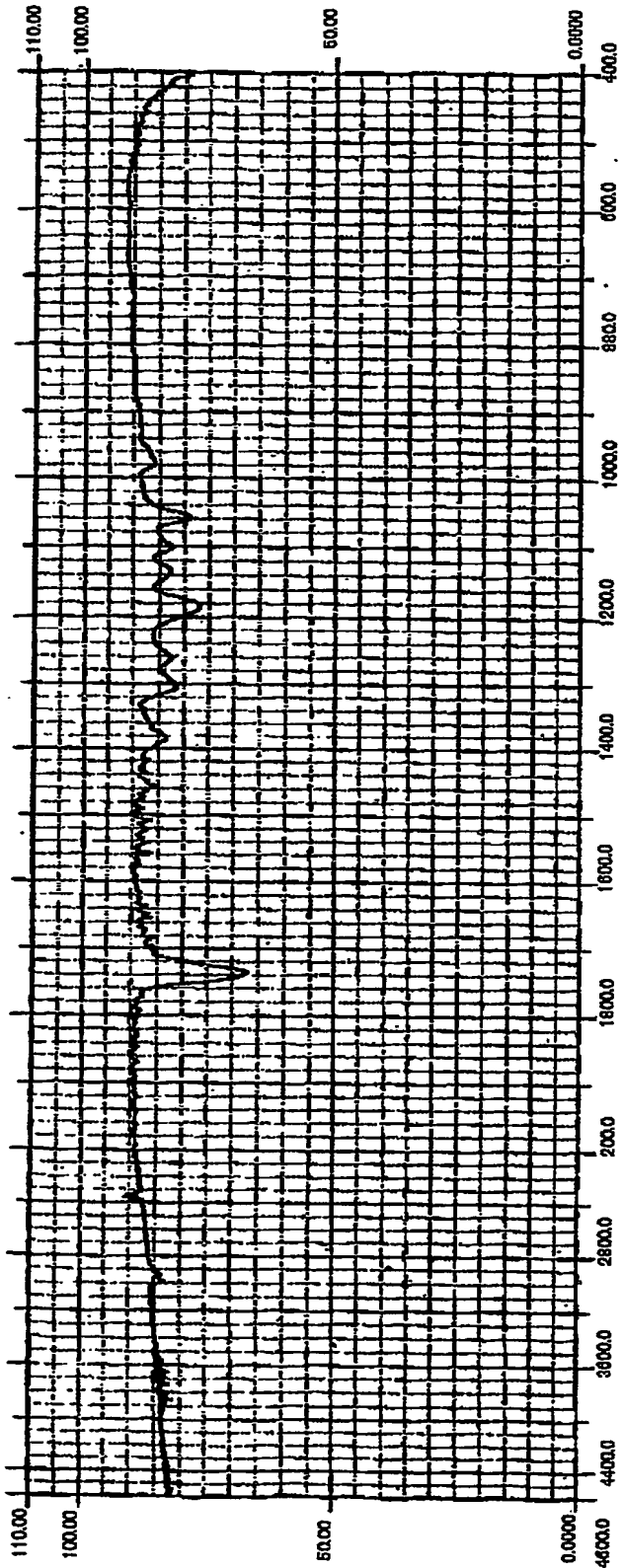
【図6】



【図7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ポリエステル合成に関与する遺伝子発現カセットを酵母に導入して形質転換した形質転換体、及び、得られた形質転換体を培養することにより、生分解性かつ優れた物性を有する P (3 H B - c o - 3 H H) 等のポリエステルを酵母を宿主として製造する方法を提供する。

【解決手段】 酵母に、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現カセットが一種以上導入されてなる形質転換体。

【選択図】 なし

特 2 0 0 0 - 1 4 8 7 2 6

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 1 4 8 7 2 6
受付番号	5 0 0 0 0 6 2 2 1 6 9
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 2 年 5 月 2 2 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成12年 5月19日

次頁無

特2000-148726

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

氏 名 鐘淵化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.